

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890097
 研究課題名(和文) 新規抗菌分泌タンパクFDC-SPを応用した予防医療的ハイブリッド歯周治療法の開発
 研究課題名(英文) Functional analysis of novel secreted protein, FDC-SP for preventive therapy against periodontitis.
 研究代表者
 中村 さやか(Nakamura Sayaka)
 名古屋大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：40437033

研究成果の概要:歯周組織特異的遺伝子の探索において発見された新規遺伝子 FDC-SP は歯周組織および耳下腺に特徴的に発現を示す遺伝子で、構造的には唾液成分のスタテリンと類似していることが明らかになっていた。本研究において、FDC-SP は歯肉の接合上皮に局所的に発現していることが明らかになり、抗菌ペプチドとして歯周病原細菌等の外的刺激から歯周組織を保護して口腔内において生体防御機能を担っている可能性が示唆された。今後、FDC-SP の新規歯周病予防法への応用が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
総計	2,660,000	402,000	3,062,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：歯周病学、抗菌タンパク、歯周組織、接合上皮、生体防御、FDC-SP

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患に罹患する患者は高齢社会において増加の一途をたどっており、また全身疾患との関連性が示唆されてさらなる注目を集めているが、未だその効果的な予防方法、治療法は確立されておらず、新たな方法の開発が急務である。

歯周疾患は、細菌と宿主の防御メカニズムとの相互作用の結果引き起こされるため、宿主の免疫システムについて明らかにすることは歯周病予防、診断、新規治療法の開発にとって重要である。口腔内における生体防御

機構としては、緻密で強固な細胞間結合をもつ上皮がバリアーとなり細菌やその代謝産物の侵入を防いでいるのに加えて、抗菌ペプチドをはじめとするタンパク質が唾液腺や歯肉・粘膜上皮より分泌され、侵入しようとする微生物の排除に重要な働きをしている。抗菌ペプチドは、病原微生物などの異物の侵入を防ぐ第一線の防御機構である自然免疫系として働いており、抗原非特異的で病原体に対して直接的な抗菌作用がある。特に口腔内では、唾液成分であるスタテリンやヒスタチン、腸管粘膜免疫において重要な機能を果

たしているデフェンシンなどが知られている。

2. 研究の目的

歯周組織特異的遺伝子の探索において発見された FDC-SP は、歯周組織、耳下腺に特異的に発現しており、その分子構造は唾液成分であるスタテリンや腸管粘膜免疫において重要な機能を果たしているデフェンシンと類似していることが示されている。[Biochem. Biophys. Res. Commun. 338 (2005) 1197-1203] このことより、FDC-SP は唾液や歯肉溝滲出液中に存在して、新規抗菌ペプチドとして機能し、生体防御に関与している可能性が推察されている。そこで、本研究では、口腔内における FDC-SP の機能解析、治療への応用の可能性を探ることにより有用性を検討し、歯周疾患罹患の予知性診断、抗菌作用を組み込んだ予防歯周病治療剤、標的タンパク質による新規治療法の開発等の臨床応用を目指すものとする。

3. 研究の方法

(1) RT-PCR 法

胎生 18 日および 1、2、3、4、6 週齢の ICR マウスより麻酔下にて歯胚、気管および唾液腺を摘出後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて RNA 調製を行った。調製した RNA を用いて Titan One Tube RT-PCR System (Roche 社)により、歯および歯周組織と唾液腺の発生段階における発現の有無を解析した。

(2) in situ ハイブリダイゼーション

1、2、3、4、6 週齢の ICR マウスより麻酔下にて下顎を摘出、固定、脱灰の後、凍結切片を作製した。8 週齢 ICR マウスより摘出した唾液腺より調製した RNA を鋳型として、FDC-SP 等特異的プライマーで FDC-SP cDNA を合成後、DIG RNA Labeling Kit (Roche 社)を用いて FDC-SP センス、アンチセンス RNA プローブを作製した。各切片は、プロテアーゼ処理後、通法に従い in situ ハイブリダイゼーションを行った。

(3) 抗ヒト標的抗菌タンパク質 (FDC-SP) 抗体の作製

ヒト標的タンパク質 (FDC-SP) の親水性領域である FPVSQDQEREKRSISD ペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。作製した抗体は、プロテイン A カラムにて精製した。また、His- FDC-SP タンパクを、大腸菌を用いて合成し、ELISA 法により抗ヒト標的タンパク質 (FDC-SP) 抗体の抗体価の確認を行った。

4. 研究成果

(1) RT-PCR により、FDC-SP は胎生期においては歯胚、気管および唾液腺には発現せず、出生後に発現すること、遊離歯肉には強い発現が認められたが、歯槽粘膜には発現が認められないことが示され、口腔内において発現に局在があることが示唆された (図 1, 2)。

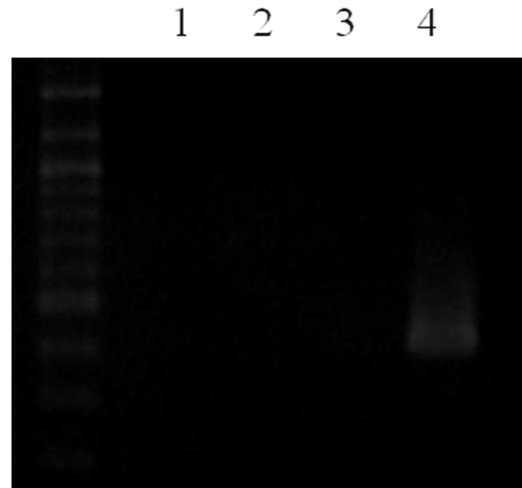


図 1 RT-PCR (1; 胎生 18 日歯胚、2; 胎生 18 日気管、3; 胎生 18 日唾液腺、4; 4 週唾液腺)



図 2 RT-PCR (1; 6 週遊離歯肉、2; 6 週歯槽粘膜)

(2) マウスを用いた in situ ハイブリダイゼーションにより、歯の萌出前の胎生 18 日、1、2 週齢の歯胚においては、FDC-SP

はほとんど発現が認められず、歯の萌出に伴い特に接合上皮において非常に強い発現が認められることが明らかになった（図3）。

（3）抗ヒト FDC-SP 抗体を作製し、合成した His-FDC-SP タンパクを用いて ELISA 法を行ったところ、作製した抗ヒト FDC-SP 抗体は良好な抗体価を示した。また、同様に His-FDC-SP 合成タンパクを用いてウエスタンブロット法を行ったところ、特異的な反応が検出された。以上のことより、作製した抗ヒト FDC-SP 抗体は FDC-SP 特異的な良好な抗体であることが確認された。

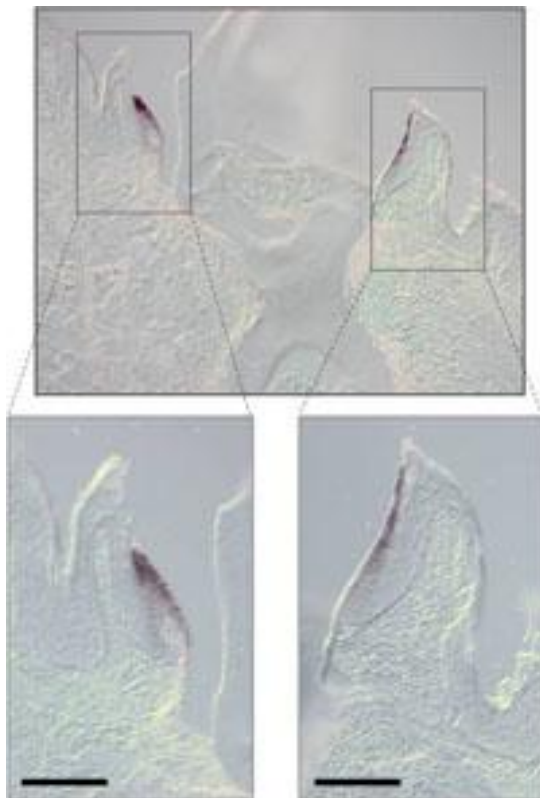


図3 FDC-SP の接合上皮における発現 (in situ ハイブリダイゼーション)

以上のように、FDC-SP 発現は微生物や他の有害因子より歯周組織を防御する最前線である接合上皮に局在が認められることが示されたことから、様々な病原性細菌や外的刺激に曝されている口腔内において、スタテリンのように生体防御機能を担っていることが推察され、新規抗菌ペプチドとしてその意義は大きいと考えられる。今後、作製した抗ヒト FDC-SP 抗体を用いてタンパクレベルでの発現確認、唾液および歯肉溝浸出液中に含まれているか否か、また歯周疾

患罹患時の FDC-SP 分布の変化等を検討することにより、FDC-SP の機能分析を行う予定である。FDC-SP の抗菌機能が明らかになれば、将来歯周疾患の予防および治療に有効な新規薬剤開発へと発展する可能性を秘めており、その有用性は高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

① Shinomura, T., Nakamura, S., Ito, K., Shirasawa, SI., Hook, M. and Kimura, JH. Adsorption of FDC-SP onto mineral deposits- application of a new stable gene expression system, J Biol Chem 283(48) 33658-64, 2008 査読有

② Nakamura, S., Yamada, Y., Baba, S., Kato, H., Kogami, H., Takao, M., Matsumoto, N. and Ueda, M. Culture medium study of human mesenchymal stem cells for practical use of tissue engineering and regenerative medicine, Biomed Mater Eng: 18(3): 129-136, 2008 査読有

③ Yamada, Y., Nakamura, S., Ito, K., Kohgo, T., Hibi, H. and Ueda, M. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: Clinical application report from a 2-6-year follow-up, Tissue Eng Part A: 14(10): 1699-1707, 2008 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

① 中村さやか
ヒト乳歯歯髓由来幹細胞の特性の検討、第129回日本歯科保存学会学術大会、2008. 11. 6-7、富山

② Nakamura S.
The novel sinus floor augmentation using injectable tissue-engineered bone. 17th Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration 2008. 9. 18-20 Warsaw, Poland

③ 篠村多摩之
新規遺伝子発現システムを用いた歯根膜成分の機能解析、第40回日本結合組織学会学術大会、2008. 5. 29-31、東京

〔図書〕（計 1 件）

① 中村さやか、永井書店、総合臨床、2009、
33-35

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 さやか (Nakamura Sayaka)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40437033